

## ARTÍCULOS DE REVISIÓN

REV MED UNIV NAVARRA/VOL 46, N°

# Utilización de Células Madre en Terapia Regenerativa Cardíaca

**F. Prósper, A. Pérez, J. Cosín, A. Panizo, J. Rifón, M. Hernández, J. Pérez-Calvo, G. Rábago, S. Inogés, E. Rocha, J. Herreros**

*Servicio de Hematología y Area de Terapia Celular. Departamento de Anatomía Patológica y Departamento de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Clínica Universitaria. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra*

## Correspondencia

Felipe Prósper

Servicio de Hematología y Area de Terapia Celular. Clínica Universitaria. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra

Av Pio XII, 36

31008 Pamplona

(fprosper@unav.es)

## Resumen

La posibilidad de utilizar células madre en el tratamiento de diversas enfermedades humanas como la diabetes, la enfermedad de Parkinson, la cardiopatía isquémica constituye uno de los retos mas importantes de la medicina moderna. Sin embargo, antes de que los resultados de los estudios con células madre se traduzcan clínicamente existen múltiples problemas que deben ser resueltos. A continuación trataremos de exponer algunos conceptos relacionados con las células madre y su potencial, centrándonos principalmente en las células madre adultas tal como han sido recientemente descritas por el grupo de Catherine Verfaillie. Además presentaremos resultados de alguno de los primeros estudios clínicos realizados con células madre adultas como forma de terapia regenerativa cardíaca. En dichos trabajos se han empleado células madre de músculo (células satélite) autólogas en pacientes con infarto de miocardio, inyectándose directamente dichas células en la periferia de la cicatriz secundaria al infarto.

**Palabras clave:** Mioblasto. Células Madre Adultas. Regeneración Cardíaca.

## Introducción

Desde que en 1998, el grupo de Thomson demostrara la posibilidad de obtener células madre pluripotenciales a partir de la capa celular de la masa interna del blastocisto humano<sup>1</sup>, numerosos estudios han demostrado la gran capacidad proliferativa y diferenciadora de estas células y sus potenciales aplicaciones en el tratamiento de enfermedades humanas como la diabetes, la enfermedad de Parkinson o la insuficiencia cardíaca<sup>2-4</sup>. Indudablemente, la utilización de células derivadas de embriones o fetos humanos conlleva una serie de problemas tanto éticos como científicos que han estimulado la búsqueda de otras alternativas y mas concretamente la posibilidad de la utilización de células madre obtenidas a partir de tejidos adultos<sup>5</sup>.

Antes de exponer algunos de los estudios que demuestran la existencia de células madre adultas y su potencial creemos que sería interesante definir algunos conceptos generales rela-

## Summary

One of the most important challenges in modern medicine is the use of stem cells for the treatment of human disease such as diabetes, Parkinson's disease or ischemic cardiomyopathy. A number of problems need to be solved before stem cells can be applied clinically. In this paper we will review some concepts related to the potential of stem cells, focusing on adult stem cells as they have recently been described by the group of Catherine Verfaillie. We will also present our initial clinical results using adult stem cells for cardiac regenerative therapy. In the studies mentioned above, autologous muscle stem cells (satellite cells) were infused directly in the periphery of the scar tissue of the infarct. We describe the technique for ex vivo expansion and purification of muscle stem cells.

**Key Words:** Myoblast. Adult Stem Cell. Cardiac Regenerative Therapy.

cionados con las células madre: ¿Que propiedades caracterizan a la célula madre y la definen como tal?

1. capacidad de proliferar sin diferenciarse durante períodos de tiempo prolongado, en principio durante el tiempo de vida del órgano del que procede;
2. las células madres tienen la capacidad de diferenciarse hasta formar células maduras y funcionales. Una célula madre es capaz de generar células maduras existentes en distintos tejidos maduros;
3. capacidad diferenciadora in vivo, en otras palabras una célula madre es capaz de una vez injertada en un animal de experimentación, diferenciarse hacia células maduras y funcionales.

Otro concepto importante es el de pluripotencialidad y multipotencialidad. Aunque estos términos y otros similares se han utilizado con cierta ambigüedad, al hablar de células madres pluripotenciales hablamos de células con las característi-

cas antes descritas capaces de diferenciarse *in vitro* e *in vivo* a tejidos derivados de cualquiera de las tres capas embrionarias, ectodermo, mesodermo y endodermo. Las células madre embrionarias humanas obtenidas de la masa celular interna del blastocisto o de la cresta gonadal fetal han demostrado su capacidad de diferenciarse a tejidos de diferentes orígenes embrionarios tanto somáticos como células germinales. Su capacidad proliferativa es prácticamente ilimitada gracias en parte a que expresan actividad telomerasa. Sin embargo a pesar de su enorme potencialidad existen numerosos obstáculos para su utilización clínica. Las células madre embrionarias inducen la formación de teratomas al ser infundidas en animales de experimentación (tumores benignos), mientras que el control de su diferenciación es complejo cuando menos.

Además de las células madre pluripotenciales, estarían las células madre multipotenciales. Tanto en animales de experimentación como en el ser humano se han identificado células madre en diferentes tejidos como el SNC, hígado, músculo, médula ósea, epidermis o epitelio gastrointestinal<sup>6-8</sup>. Estas células son capaces de proliferar durante tiempos prolongados pero su capacidad diferenciadora se limita en general a los tejidos existentes en los órganos de los cuales se derivan y por ello se llaman células madre multipotenciales.

De forma muy reciente diversos estudios indican que células madre con un origen embrionario concreto son capaces de generar tejidos que derivan de una capa embrionaria diferente<sup>9-14</sup>. Este concepto se ha denominado versatilidad de las células madre o capacidad de transdiferenciación. Aunque demostrar la capacidad transdiferenciadora de una célula exige la utilización de criterios estrictos y muchos de los trabajos publicados no cumplen estos requisitos, la existencia de esta propiedad por parte de algunas poblaciones celulares está aceptada. Así, por ejemplo, se ha demostrado que células obtenidas de médula ósea (mesodermo) son capaces de generar *in vivo* tejido hepático (endodermo) o tejido neuronal (ectodermo). También células madre aisladas del SNC son capaces de producir células hematopoyéticas.

### Células madre adultas multipotenciales (MAPC)

De forma simultánea al desarrollo de las células madre embrionarias, diversos grupos de investigación han trabajado en la identificación y caracterización de una población celular con características de células madres pluripotenciales, pero obtenidas a partir de tejido adulto<sup>5,15-18</sup>. Las implicaciones desde el punto de vista clínico de la existencia de células madre pluripotenciales adultas sería obviamente importantes, ya que su utilización conllevaría ventajas no solo desde el punto de vista ético sino también clínicas como comentaremos a continuación.

Existen diversos trabajos que demuestran en animales de experimentación que a partir de médula ósea o SNC es posible aislar células madre con capacidad pluripotencial. Sin embargo nos gustaría centrarnos en los trabajos del grupo de la Universidad de Minnesota dirigido por la Dra. Catherine Verfaillie<sup>15</sup>. En el trabajo recientemente publicado, Reyes y col describen que a partir de médula ósea obtenida de donantes sanos es posible aislar una población de células madre que se copurifican a partir de las células madre mesenquimales y que se han denomi-

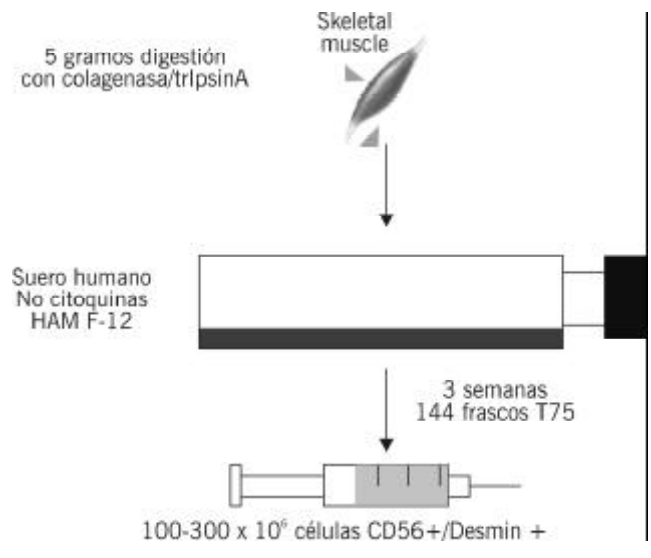
nado células madre adultas multipotenciales (MAPC). Las MAPC se caracterizan por la ausencia de expresión de antígenos específicos de células comprometidas (CD34-, CD44-, CD45-, HLA clase I y II -, c-kit-) y por la expresión de factores transcripcionales de células madre pluripotenciales como Rex-1 y Oct4. Las MAPC humanas se pueden expandir *in vitro*, cultivándolas en medio con una concentración baja de suero (2%) en presencia de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). En estas condiciones las MAPC pueden proliferar durante más de 100 duplicaciones sin acortar la longitud de sus telómeros, gracias a la expresión de actividad telomerasa.

Uno de los aspectos fundamentales de las MAPC es su capacidad diferenciadora. Al sustituir el medio de expansión por medio de diferenciación se puede inducir la diferenciación a tejidos de distintos orígenes embrionarios. Las MAPC humanas al igual que las células madre mesenquimales se diferencian a tejidos derivados mesodérmico como osteoblastos, condroblastos, músculo estriado esquelético y cardíaco o endotelio. Sin

**Tabla 1.** Comparación entre las características de las células madre embrionarias y las células madre adultas pluripotenciales

	Célula Madre Embrionaria	Célula Madre Adulta
Formación de Teratomas <i>in vivo</i>	Sí	No
Capacidad proliferativa	+++	++
Pluripotencialidad	Sí	Sí
Control de la diferenciación	±	++
Terapia celular autóloga	No	Sí

**Figura 1.** Esquema del cultivo de mioblastos a partir de músculo estriado para la realización de la cardiomioplastia celular autóloga. Las cifras corresponden a los valores obtenidos para el ensayo clínico en pacientes con Infarto de Miocardio



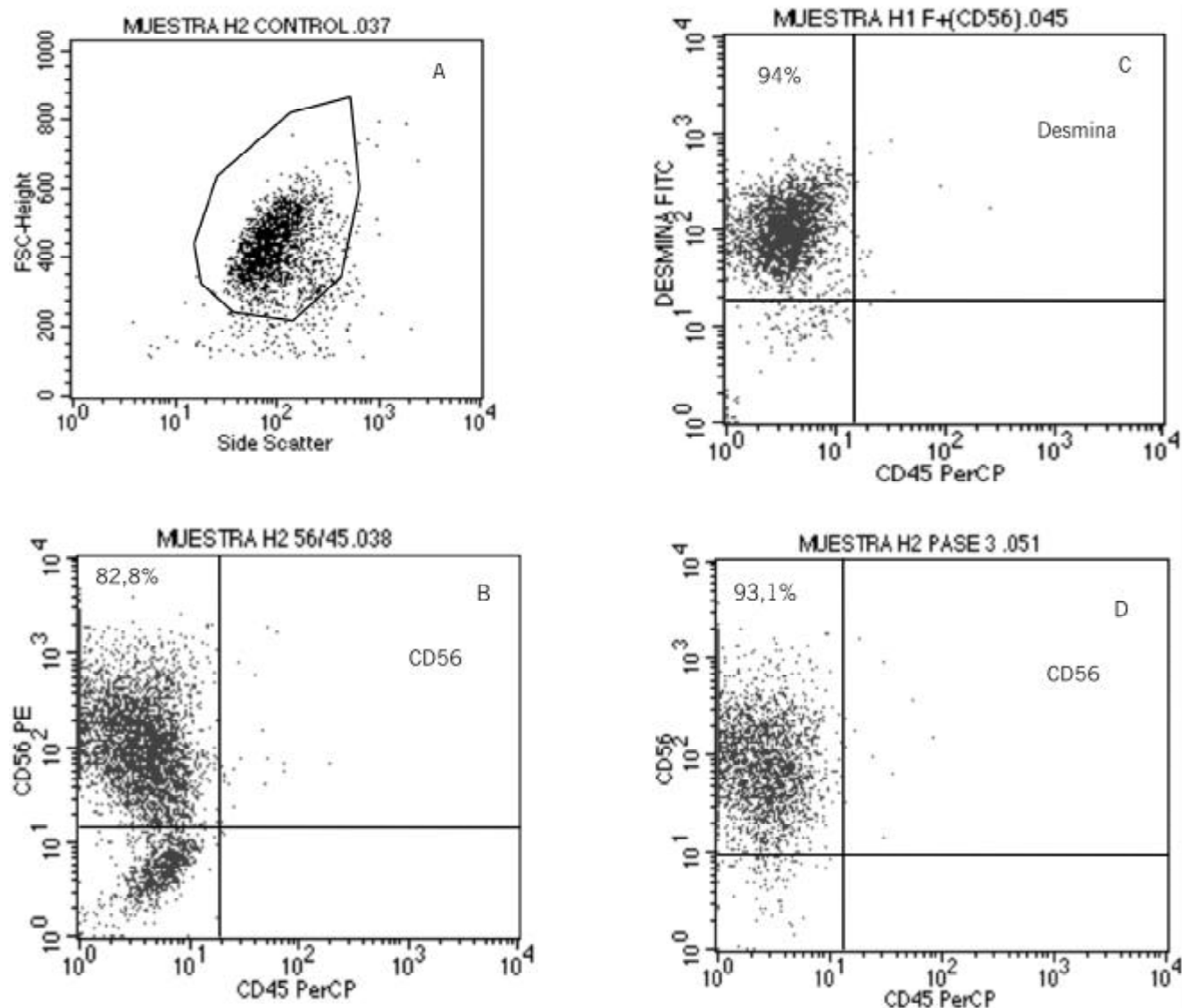
embargo a diferencia de las células madre mesenquimales (MSC) las MAPC humanas son también capaces, en función de las condiciones en el medio de diferenciación de generar tejidos derivados ectodérmicos como neuronas dopaminérgicas, gabaérgicas, oligodendrocitos o microglia así como también derivados endodérmicos como epitelio gastrointestinal o hígado.

Además de generar diferentes tejidos in vitro, las MAPC humanas son capaces de generar tejidos maduros y funcionales cuando son trasplantadas en animales de experimentación contribuyendo a la reconstitución de órganos derivados de capas embrionarias diferentes. Igualmente se han podido aislar MAPC de rata y ratón habiendo demostrado que la inyección de 1 a 12 células MAPC de ratón en un blastocisto de ratón da lugar a

animales quiméricos con presencia de tejidos derivados de las MAPC en la mayoría de los órganos.

Todos estos estudios, algunos de los cuales han sido publicados exclusivamente de forma preliminar indican de forma clara la existencia de células madre pluripotenciales en la médula ósea adulta. Obviamente estos estudios no nos permiten determinar si estas células son un artefacto del sistema de cultivo que induce la reprogramación celular, de forma análoga a lo que se produciría al realizar clonación terapéutica utilizando un oocito anucleado y el núcleo de una célula somática, o si se trata de vestigios embrionarios. En cualquier caso abren nuevas perspectivas de aplicación clínica de las células madre con indudables ventajas sobre las células madre embrionarias (Tabla 1).

**Figura 2.** Expresión de desmina y CD56 por citometría de flujo en células musculares derivadas de células satélite y expandidas in vitro. A y B corresponden a la citometría realizada tras el primer pase del cultivo (preplating). C y D corresponde a la citometría realizada tras finalizar el cultivo y recolectar las células para su infusión



## Utilización de células madre en terapia regenerativa cardíaca

Nos gustaría dedicar el último apartado a discutir una de las potenciales aplicaciones terapéuticas de las células madre como es su utilización para el tratamiento de las alteraciones de la función miocárdica secundarias a la necrosis del músculo cardíaco asociada al infarto de miocardio. Existen diversas fuentes de células madre que al menos desde un punto de vista hipotético podrían utilizarse para reparar el tejido cardíaco necrosado y que incluyen cardiomiocitos fetales, células madre cardíacas, células madre de médula ósea (MAPC) o células madre embrionarias diferenciadas hacia músculo cardíaco. Sin embargo las células con las que mayor experiencia existe en modelos animales son las células satélite o mioblastos.

Las células satélite se localizan por debajo de la membrana basal de las fibras de músculo estriado<sup>6</sup>. Son las células madres musculares responsables de regenerar las fibras esqueléticas destruidas como consecuencia de traumatismos o fenómenos degenerativos. La gran capacidad regenerativa de estas células así como la capacidad del músculo esquelético de responder a estímulos eléctricos apoyan la utilización de mioblastos autólogos como forma de mejorar la función contráctil del músculo cardíaco necrosado. Este tipo de tratamiento ha recibido el nombre de cardiomioplastia celular<sup>19</sup>. Existen diversos modelos animales en los que se ha utilizado la cardiomioplastia celular como tratamiento de la disfunción cardíaca secundaria al infarto de miocardio. De los estudios realizados en animales de experimentación podemos sacar algunas conclusiones: es posible expandir in vitro mioblastos en número suficiente para realizar la cardiomioplastia celular; en los cultivos de mioblastos existe una contaminación por células no musculares que oscila entre el 30-70% principalmente a expensas de fibroblastos; la transfusión de mioblastos generalmente de forma directa mediante inyección en la zona miocárdica adyacente al tejido infartado se asocia con un injerto de los mioblastos y diferenciación hacia células musculares con capacidad contráctil, incluso en algunos casos pudiendo adquirir las fibras musculares características específicas de músculo cardíaco; la cardiomioplastia celular se asocia con una mejoría de la función cardíaca principalmente a nivel diastólico pero también sistólico<sup>20-23</sup>. Los resultados obtenidos en animales de experimentación han conducido a la aplicación de esta técnica en humanos. En la actualidad se han realizado al menos 10 procedimientos de cardiomioplastia celular por el grupo del Dr. Menasche en París con resultados muy prometedores<sup>24</sup>.

En nuestro grupo basándonos en las técnicas descritas hemos optimizado el procedimiento aplicado a muestras de músculo obtenido de pacientes. El procedimiento que utilizamos comienza con la digestión de una biopsia muscular de 5-10 gramos y el cultivo de las células obtenidas en medio HAM F12 suplementado con un 10% de suero humano. Tras un período inicial de 5-7 días, se realiza un primer pase del cultivo a la vez que se someten a las células a un "preplating" con el objetivo de eliminar la fracción de fibroblastos contaminante. Tras mantener las células en cultivo durante otros 7 días realizamos un segundo pase. El cultivo se finaliza entre el día 20-22

mediante la tripsinización y recolección de todos los frascos de cultivo (Figura 1).

Antes de implantar las células cultivadas es necesario determinar y cuantificar el porcentaje de mioblastos o miocitos y de células contaminantes. Utilizando técnicas de citometría de flujo hemos podido demostrar que los mioblastos y células musculares expresan el antígeno CD56 en la membrana celular mientras que tanto por citometría de flujo intracitoplasmática como mediante inmunohistoquímica se demuestra que los mioblastos expresan desmina en el citoplasma. Existe una correlación entre el porcentaje de células que expresan desmina bien por citometría de flujo como por inmunohistoquímica y el porcentaje de células CD56 positivas (Figura 2). Hemos estudiado la expresión de otros marcadores musculares como factores transcripcionales musculares tipo MyoD. En aproximadamente la mitad de los pacientes no es posible obtener con la técnica de cultivo estándar un porcentaje de células musculares superior al 40%. Gracias a la expresión de CD56 y utilizando un sistema de aislamiento mediante microesferas inmunomagnéticas marcadas con CD56 hemos podido incrementar la pureza de la población de mioblastos siempre por encima del 70%. Esta población purificada se puede nuevamente mantener en cultivo sin que su capacidad proliferativa se vea afectada por el proceso de selección.

En conclusión, la optimización del cultivo y selección de mioblastos obtenidos de tejido muscular humano ha permitido desarrollar un ensayo clínico de cardiomioplastia celular autóloga que se ha iniciado de forma reciente. Los resultados clínicos de este ensayo fase I permitirán establecer la utilidad de esta técnica en el tratamiento de la disfunción cardíaca secundaria al infarto de miocardio.

## Bibliografía

1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282(5391):1145-7.
2. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, *et al.* Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001;107(11):1395-402.
3. Kondziolka D, Wechsler L, Goldstein S, Meltzer C, Thulborn KR, Gebel J, *et al.* Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* 2000;55(4):565-9.
4. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. From the cover: effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(21):11307-12.
5. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, *et al.* Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105(3):369-77.
6. Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 2000;218(2):115-24.
7. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, *et al.* Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(26):14720-5.

8. Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 2000;105(12):1663-8.
9. Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med* 2001;7(4):393-5.
10. Alison MR, Poulsom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, *et al.* Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000;406(6793):257.
11. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, *et al.* Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6(11): 1229-34.
12. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, *et al.* Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999;103(5):697-705.
13. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000;290(5497):1779-82.
14. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410(6829):701-5.
15. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001;98(9):2615-25.
16. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, *et al.* Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001;3(9): 778-84.
17. Rietze RL, Valcanis H, Brooker GF, Thomas T, Voss AK, Bartlett PF. Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* 2001;412(6848):736-9.
18. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, *et al.* Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000;288(5471):1660-3.
19. Marelli D, Desrosiers C, el-Alfy M, Kao RL, Chiu RC. Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant* 1992;1(6):383-90.
20. Chiu RC, Zibaitis A, Kao RL. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg* 1995;60(1):12-8.
21. Dorfman J, Duong M, Zibaitis A, Pelletier MP, Shum-Tim D, Li C, *et al.* Myocardial tissue engineering with autologous myoblast implantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;116(5):744-51.
22. Nadal-Ginard B. [Generation of New Cardiomyocytes in the Adult Heart: Prospects of Myocardial Regeneration as an Alternative to Cardiac Transplantation]. *Rev Esp Cardiol* 2001;54(5):543-50.
23. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, *et al.* Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998;4(8):929-33.
24. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, *et al.* Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357(9252):279-80.